

**ENZYMIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG DER
ACETYLCHOLIN-REZEPTOR-ANTIKÖRPER
-METHODIK UND BEDEUTUNG**

Doris U. Werner

Disbui. München

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0108

**Aus dem Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern
der Universität München**

Vorstand: Professor Dr.med.M.Knedel

**ENZYMIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG DER ACETYLCHOLIN-REZEPTOR-
ANTIKÖRPER - METHODIK UND BEDEUTUNG**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Doris Werner

aus

München

1987

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr.med. A. Fateh-Moghadam

1. Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. M. Knedel

2. Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	5
1.1. Myasthenia gravis-eine Autoimmunerkrankung	5
1.2. Acetylcholinrezeptor-Antikörper bei Myasthenia gravis	7
1.3. Problemstellung	9
II. THEORETISCHER TEIL	10
II.1. Prinzip des Immunpräzipitations-Assays	10
II.2. Der Enzymimmunoassay	12
II.2.1. Allgemeines	12
II.2.2. Prinzip des ELISA	13
II.2.3. Konzept eines ELISA für AChR-Antikörper	15
III. EXPERIMENTELLER TEIL	17
III.1. Präparation des Humanmuskelextraktes	17
III.2. Durchführung des Immunpräzipitations-Assays	18
III.3. Der ELISA	20
III.3.1. Röhrchenbeschichtung	20
III.3.1.1. Allgemeines	20
III.3.1.2. Pufferbeschichtung	21
III.3.1.3. Glutaraldehydmethode	22
III.3.1.4. Auswertung	23
III.4. Durchführung des ELISA	26
III.5. Materialien	31

	Seite
IV. ERGEBNISSE	32
IV.1. Standardkurve	32
IV.2. Linearität und Meßbereich	35
IV.3. Präzision	36
IV.4. Störfaktoren	37
IV.5. High-Dose-Hook-Effekt	39
IV.6. Referenzbereich	40
IV.7. AChR-Ak-Titer bei Patienten mit MG	41
IV.8. Methodenvergleich	42
IV.9. Verlaufskontrollen	44
IV.10. Haltbarkeit der Reagentien	47
V. DISKUSSION	48
V.1. Methodischer Teil	48
V.2. Klinischer Teil	55
VI. ZUSAMMENFASSUNG	58
VII. LITERATURVERZEICHNIS	60

I. EINLEITUNG

1.1. *Myasthenia gravis*—eine Autoimmunerkrankung

Bei der *Myasthenia gravis* (MG) handelt es sich um eine neuromuskuläre Erkrankung, die zu Schwäche und abnormer Ermüdbarkeit der Muskulatur führt.

Nach OSSERMAN läßt sich die *Myasthenie* wie folgt klassifizieren (22):

- I okuläre MG
- IIa leichte generalisierte MG mit okulären Symptomen
- IIb mittelschwere generalisierte MG mit leichten bulbären Symptomen
- III akute schwere MG mit bulbären Symptomen
- IV schwere MG, die sich aus I, IIa oder IIb entwickelt

Tab.1: Klassifikation der MG nach OSSERMAN

Schon 1960 hatte SIMPSON die Hypothese aufgestellt, daß es sich bei der *Myasthenie* um eine Autoimmunerkrankung handelt (29).

In den 70er Jahren belegten dann folgende Beobachtungen diese Hypothese:

- 1.) 1973 gelang es PATRICK und LINDSTRÖM sowie unabhängig davon SUGIYAMA, bei Kaninchen durch Immunisierung mit gereinigtem Acetylcholinrezeptor (AChR) vom Torpedofisch ein myasthenieähnliches Krankheitsbild zu induzieren (24,30).

- 2.) 1976 konnten TOYKA et al. durch passive Übertragung von IgG aus Patientenseren bei Mäusen ein myasthenisches Syndrom hervorrufen (32). Dieser passive Transfer von Antikörpern hat ein natürliches Korrelat: 15% der Kinder myastheniekranker Mütter leiden an einer transienten Myasthenie, die durch diaplazentaren IgG-Transfer zu erklären ist.
- 3.) 1976 entwickelten LINDSTRÖM et al. und MITTAG et al. einen Immunpräzipitationsassay, mit dem bei 85% der Patienten mit MG Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor nachgewiesen werden konnten (19,20).

Die Autoimmunogenese der MG kann heute als gesichert gelten. Als Antigen wurde der nikotinische Acetylcholinrezeptor (AChR) der muskulären Endplatte identifiziert. Bei mehr als 90% der Myastheniepatienten kann man im Serum zirkulierende Antikörper (Ak) nachweisen, die gegen den AChR gerichtet sind. Diese Antikörper gehören zur IgG-Klasse.

Eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der MG spielt der Thymus. Bei ca. 75% der Patienten findet man Thymusveränderungen, in 85% der Fälle handelt es sich um Hyperplasien, in 15% um Thymome.

Die Rolle des Thymus in der Pathogenese der MG berücksichtigt die Drei-Stadien-Hypothese von HOHLFELD und WEKERLE (12):

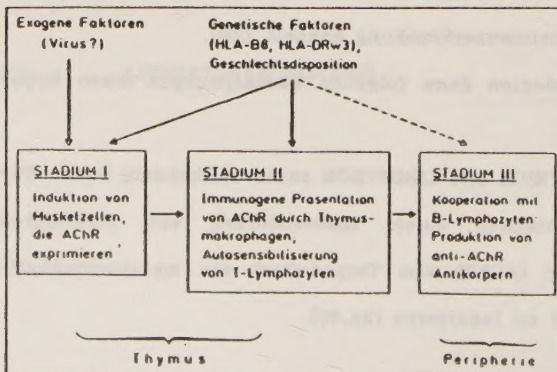


Abb.1: Drei-Stadien-Hypothese von HOHLFELD und WEKERLE

Die Interaktion der zirkulierenden Antikörper mit dem postsynaptischen AChR führt zu einer Verminderung der Zahl verfügbarer Rezeptoren.

Mehrere Pathomechanismen werden hierzu diskutiert:(1,6,15)

- 1.) Bindung von AChR-Ak mit nachfolgender Komplementaktivierung
führt zu partieller Lyse der postsynaptischen Membran
- 2.) Beschleunigung des Rezeptorabbaus durch Ak-Bindung
- 3.) pharmakologische Blockade durch die Ak (analog Curare).

Alle diese Veränderungen haben letztendlich eine Verschlechterung der neuromuskulären Übertragung zur Folge und führen zu den klassischen Symptomen der Myasthenie.

1.2. Acetylcholinrezeptor-Antikörper bei MG

Die Bestimmung der AChR-Antikörper hat sich für die Diagnostik und Verlaufskontrolle der MG als sehr empfindliches und spezifisches Kriterium erwiesen.

Zum routinemäßigen Nachweis der AChR-Ak verwendet man derzeit zu-
meist Immunpräzipitationsassays, d.h. Radioimmunoassays. Einige Arbeits-
gruppen berichten auch über enzymimmunologische Verfahren
(5,10,16,17,18,21). Keine dieser Methoden eignet sich derzeit für eine
routinemäßige Anwendung.

Trotz der großen Bedeutung der AChR-Ak-Bestimmung bei MG-Patienten
steht bis heute noch kein kommerzieller Test zur Verfügung.

In unserem Institut erfolgt die routinemäßige Bestimmung der AChR-Antikörper mit einem nach LINDSTRÖM modifizierten Immunpräzipitationsassay (11). Mit dieser Methode, die später noch genau beschrieben wird, konnten in einem großen Patientenkollektiv bei 92% der Patienten mit generalisierter MG und bei 64% der Patienten mit okulärer MG Antikörper gegen den AChR nachgewiesen werden (8,9). Bei klinisch und laborchemisch gesunden Personen, bei Personen mit anderen Autoimmunerkrankungen und bei Personen mit diversen neuromuskulären Erkrankungen wurde in keinem Fall ein falsch positiver Befund erhoben.

Interindividuell besteht keine statistisch signifikante Korrelation zwischen klinischem Schweregrad der Erkrankung (Score-Wert) und der Höhe des AChR-Ak-Titers.

Intraindividuell dagegen findet man bei den meisten Patienten eine gute Korrelation zwischen Ak-Titerverlauf und Score-Wert, wobei die AChR-Ak-Veränderungen den Änderungen des klinischen Befundes häufig vorausgehen. Ein Anstieg oder Abfall des AChR-Ak-Titers um mehr als 18% läßt immer eine wesentliche Verschlechterung oder Verbesserung des klinischen Befundes erwarten. Die Dosierung einer immunsuppressiven Therapie kann anhand des AChR-Ak-Titerverlaufes kontrolliert werden (28).

1.3. Problemstellung

Der Immunpräzipitationsassay eignet sich gut zur Bestimmung der AChR-Antikörper. Der entscheidende Nachteil dieser Methode liegt in der hohen radioaktiven Belastung, die bei der routinemäßigen Durchführung dieses Tests auftritt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen enzymimmunologischen Test zur Bestimmung der AChR-Ak zu entwickeln und diese Methode im Hinblick auf folgende Gesichtspunkte zu evaluieren:

- a) Präzision, Linearität, Meß- und Referenzbereich, Störfaktoren
- b) Eignung zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der MG
- c) Vergleich mit der RIA-Methode

Außerdem sollte die Methode im Hinblick auf eine routinemäßige Bestimmung der AChR-Ak beurteilt werden.



II. THEORETISCHER TEIL

II.1. Prinzip des Immunpräzipitationsassays

In unserem Institut erfolgt die Bestimmung der AChR-Ak mit einem nach LINDSTRÖM modifizierten Immunpräzipitationsassay (11). Bei diesem Test handelt es sich um einen Radioimmunoassay (RIA).

Als Antigensubstrat dient humaner Muskelextrakt. Die Isolierung des Acetylcholinrezeptors ist zwar prinzipiell möglich, für einen Routinetest aber zu aufwendig (13).

Daher macht man sich bei dieser Methode die Tatsache zunutze, daß sich α -Bungarotoxin, ein Schlangengift, hochspezifisch und mit hoher Affinität an den Acetylcholinrezeptor bindet (33). Mit ^{125}J -markiert dient dieses Schlangengift als Marker für den AChR.

Man inkubiert den markierten Rezeptor mit Patientenserum, wobei sich die AChR-Antikörper an den markierten Komplex binden. Anschließend fällt man den Gesamtkomplex mit anti-human-IgG aus, zentrifugiert, wäscht und bestimmt die Radioaktivität des Niederschlages im γ -Counter.

Die gemessene Radioaktivität ist proportional zur AChR-Ak-Konzentration des Patientensera.

In Abbildung 2 ist das Prinzip des Immunpräzipitationsassays schematisch dargestellt.

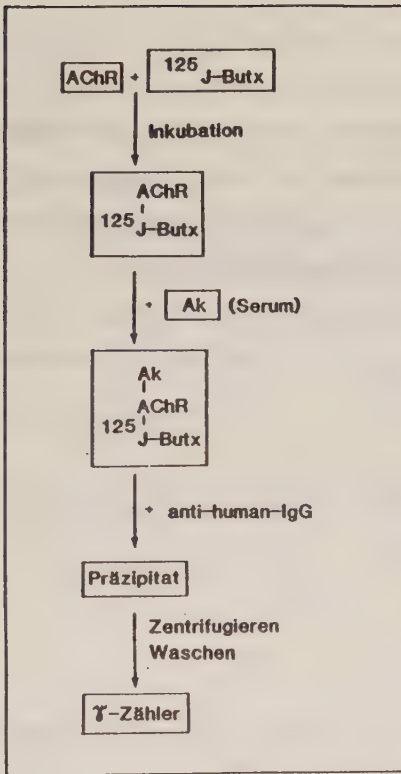


Abb.2: Prinzip des modifizierten Immunpräzipitationsassays
nach LINDSTRÖM

II.2. Der Enzymimmunoassay

II.2.1. Allgemeines

Der Enzymimmunoassay (EIA) basiert ebenso wie der Radioimmunoassay auf der Tatsache, daß sich Antikörper fest, aber reversibel an ein spezifisches Antigen binden. Während beim RIA ein radioaktiver Marker verwendet wird, arbeitet der EIA mit einem Enzym als Marker.

Es gibt eine große Anzahl verschiedener Varianten dieser Assays, in der Praxis beschränkt man sich zumeist auf eines der vier folgenden Testprinzipien (27,28):

- 1) Kompetitiver EIA
- 2) Immunenzymometrischer Assay
- 3) Sandwich-Antigen-Assay
- 4) Sandwich-Antikörper-Assay.

Im Folgenden soll genauer auf 4) eingegangen werden, da dieses Prinzip der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt (7).

Beim Sandwich-Antikörper-Assay ist das Antigen an eine Festphase gebunden (ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay). Die Reaktion des spezifischen Antikörpers mit dem festphasengebundenen Antigen wird mit Hilfe eines zweiten, gegen den ersten gerichteten, markierten Antikörpers gemessen.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß eine einfache und schnelle Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes von ungebundenem Antigen und Antikörpern möglich ist, da nur die gebundenen Antikörper an der Festphase zurückbleiben.

Die Trennung gebundener Aktivitäten von freien Proteinen erfolgt durch Waschen zwischen den einzelnen Reaktionsschritten.

II.2.2. Prinzip des ELISA (4,7,25)

II.2.2.1. Beschichtung der Festphase mit Antigen



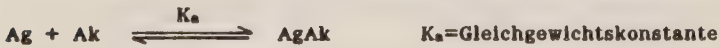
Als Festphase verwendet man Plastikröhrchen oder Mikrotiterplatten. Die Präzision und auch die Sensitivität eines ELISA ist stark von der Qualität und Reproduzierbarkeit der Festphasenbeschichtung abhängig.

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Festphasenbeschichtung beschrieben (3,23). Das Antigen wird entweder direkt oder nach entsprechender Vorbehandlung des Trägermaterials an die Festphase gebunden. Das jeweils optimale Verfahren zur Beschichtung muß für jeden geplanten ELISA experimentell ermittelt werden.

II.2.2.2. Inkubation mit antikörperhaltigem Probenmaterial



Die Interaktion von Antigen (Ag) mit Antikörper (Ak) läßt sich als Gleichgewichtsreaktion mit folgender Gleichung beschreiben:



$$K_a = \frac{\text{AgAk}}{\text{Ag} \cdot \text{Ak}}$$

Hierbei ist die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes abhängig von der Affinität des Antikörpers zum Antigen. Das Antigen muß im Überschuß vorliegen, damit genügend Antikörper gebunden werden.

II.2.2.3. Inkubation mit Enzym-Antiglobulin-Konjugat



Das enzymmarkierte Agens ist von entscheidender Bedeutung für jeden EIA. Grundsätzlich sind viele Enzyme zur Markierung geeignet, am häufigsten verwendet man Meerettlich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase.

II.2.2.4. Zugabe von Enzymsubstrat



Nach Zugabe des entsprechenden Enzymsubstrates wird inkubiert und nach einer festgesetzten Zeit die Reaktion durch Säurezugabe gestoppt. Anschließend bestimmt man die Extinktionen der farbigen Lösungen und berechnet anhand einer Eichkurve die Konzentrationen der Antikörper. Bei immunologischen Reaktionen beobachtet man häufig eine nicht-lineare Abhängigkeit zwischen Meßsignal und Konzentration. Es resultieren oft Kurven höherer Ordnung, die, wenn nötig, mittels entsprechender Programme linear transformiert werden können (26).

II.2.3. Konzept eines ELISA für AChR-Antikörper

Das Grundprinzip eines ELISA für AChR-Ak besteht aus folgenden Schritten:

1. Vorbehandlung der Festphase
2. Aufbringen von AChR-haltigem Substrat
3. Zugabe von antikörperhaltigem Serum
4. Zugabe von enzymmarkiertem Antiserum
5. Substratzugabe
6. Messung

Wir verwenden im Rahmen unseres Immunpräzipitationsassays humanen Muskelextrakt, somit war es naheliegend, diesen auch im ELISA einzusetzen. Um die aufwendige Reinigung des Muskelextraktes zu vermeiden, wurde α -Bungarotoxin zur selektiven Bindung des AChR an die Festphase verwendet.

Abbildung 3 zeigt den Aufbau des geplanten AChR-Antikörper-ELISA:

1) Beschichtung der Festphase mit α -Butx



2) Zugabe von AChR



3) Inkubation mit Patientenserum (Ak)



4) Inkubation mit enzymmarkiertem anti-human-IgG



5) Zugabe von Enzymsubstrat



6) Extinktionsmessung

Abb.3: Aufbau des geplanten AChR-Ak-ELISA

III. EXPERIMENTELLER TEIL

III.1. Präparation des Humanmuskelextraktes

Der humane AChR-Extrakt wurde folgendermaßen hergestellt (Abb.4):

Muskelgewebe von frisch amputierten menschlichen Gliedmaßen (arterielle Verschußkrankheit bei Diabetes oder Arteriosklerose) wird entweder bei -80°C gelagert oder sofort bei 4°C verarbeitet. Circa 1 kg Muskel aus mindestens fünf verschiedenen Amputaten wird in 2 Liter PBS (10 mMol Natriumphosphat pH 7,4, 100 mMol NaCl, 1mMol EDTA, 1mMol PMSF, 0,2% Natriumazid) bei 4°C homogenisiert. Das Rohhomogenat wird bei 20 000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird 1 Teil Zentrifugat mit 1 Teil PBS/3% Triton-X-100 erneut homogenisiert und über Nacht bei 4°C geführt. Nach Zentrifugation bei 40 000 g für 30 Minuten wird der klare Überstand ohne die oberste Lipidschicht gesammelt, in Aliquots von 100 ml aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Der AChR-Gehalt des Extraktes wird im Immunpräzipitationsassay mit AChR-Ak-Überschuß bestimmt.

Die AChR-Konzentration wird in nMol α -Butx-bindende Stellen pro Liter angegeben und beträgt für die einzelnen Chargen circa 0,6 - 1,0 nMol/l.

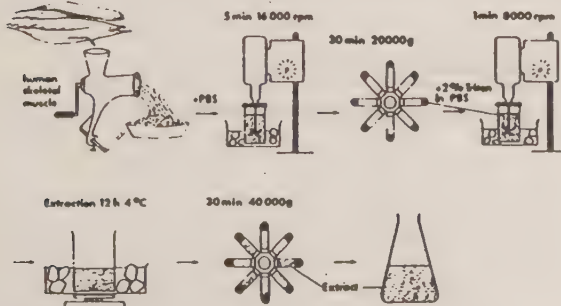


Abb.4: Präparation des humanen Muskelextraktes

III.2. Durchführung des Immunpräzipitationsassays (11)

Entsprechend der Formel:

$$^{125}\text{J-}\alpha\text{-Butx} \quad (\mu\text{l}) = \frac{8 \times \text{Extraktvolumen} \times \text{AChR-Konz. (pmol/ml)}}{^{125}\text{-J-}\alpha\text{-Butx-Konz. (fmol/ml)}}$$

wird der Rezeptorextrakt mit einem 8-fachen molaren Überschuß an $^{125}\text{J-}\alpha\text{-Butx}$ versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. In Doppelbestimmungen werden je 5 µl Serum mit 200 µl $^{125}\text{J-}\alpha\text{-Butx}$ -markiertem Extrakt versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert (Abb.5).

In jeder Serie werden zur internen Standardisierung Seren mit bekannten AChR-Ak-Konzentration und ein gepooltes Normalserum mitgeführt.

Der $^{125}\text{J-}\alpha\text{-Butx}$ -Ak-Komplex wird mit einer optimalen Menge anti-human-IgG (diese wird anhand von Vorversuchen jeweils neu ermittelt) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dabei ausgefällt. Das Präzipitat wird abzentrifugiert (2000 g, 30 min), man saugt die Überstände ab und wäscht die Pellets mit 1 ml PBS-2% Triton.

Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und die Radioaktivität der Pellets im γ -Counter gemessen. Die Ak-Konzentration errechnet sich aus der Differenz der Radioaktivität von Probe und Leerwert und wird in nmol $\alpha\text{-Butx}$ -Bindungsstellen pro Liter angegeben:

$$\text{AChR-Ak-Konz.} = \frac{(\text{CPM Probe} - \text{CPM leer}) \times N_0/N_i}{\text{Serumvol.} \times \text{spez.Akt.}^{125}\text{J-}\alpha\text{-Butx} \times Z \times K}$$

Die obere Grenze des Referenzbereichs liegt bei dieser Methode bei 0,4 nmol/L. Als pathologisch gelten Werte >0,4 nmol/L. Der lineare Bereich des RIA reicht bis max. 1,5 nmol/L; Seren mit höheren Konzentrationen müssen verdünnt werden, da sonst falsch niedrige Werte gemessen werden.

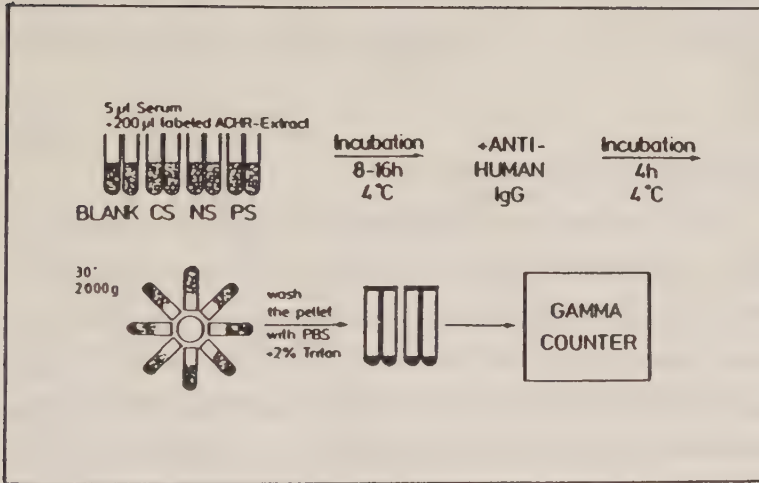


Abb.6: Arbeitsschema des Immunpräzipitationsassays
nach LINDSTRÖM

III.3. DER ELISA

III.3.1. Röhrchenbeschichtung

III.3.1.1. Allgemeines

Die Bindung von Proteinen an eine Plastikmatrix kann auf folgende Weise erzielt werden:

entweder

a) physikalisch, d.h. durch Adsorption

oder

b) chemisch, d.h. kovalent.

Die meisten Proteine adsorbieren an Kunststoffoberflächen. Man nimmt an, daß hierbei hydrophobe Wechselwirkungen zwischen einer nonpolaren Proteinunterstruktur mit der nonpolaren Plastikmatrix ausschlaggebend sind. Diese physikalische Adsorption liegt der einfachen Pufferbeschichtungsmethode zugrunde (23).

Um Proteine kovalent an eine Plastikoberfläche zu binden, muß diese Oberfläche vorbehandelt werden. Eine Möglichkeit hierzu ist die Vorbehandlung mit Glutaraldehyd (2).

Hierbei wird das zu beschichtende Material mit einer wäßrigen Glutaraldehydlösung inkubiert. Der Glutaraldehyd polymerisiert auf der Plastikoberfläche und bildet eine dünne Polymerschicht, die eine hohe Anzahl aktiver Aldehydgruppen besitzt.

Diese Aldehydgruppen können kovalente Bindungen mit primären Aminogruppen von Proteinen eingehen.

Für die Beschichtung mit α -Bungarotoxin wurden Polystyrolröhrchen verwendet. Um möglichst optimale Bedingungen für die Röhrchenbeschichtung zu ermitteln, wurde zunächst eine Reihe von Vorversuchen mit radioaktiv markiertem ^{125}J - α -Butx durchgeführt.

Es wurde eine normale Pufferbeschichtung sowie eine Beschichtung nach Glutaraldehyd-Vorbehandlung vorgenommen.

III.3.1.2. Pufferbeschichtung

Die Pufferbeschichtung wurde folgendermaßen durchgeführt (Abb.6):

Mit Carbonatpuffer, pH 9,6 wurde eine Lösung des käuflichen ^{125}J -Butx hergestellt. Die Konzentration der Lösung betrug 5 μg Butx/ml bzw. 30 ng/ml.

Polystyrolröhrchen (Firma Greiner) wurden mit je 200 μl dieser Lösung beschickt und bei 37°C 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der Röhrchen im γ -Counter gemessen. Dann wurde abgesaugt, zweimal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen und die an der Röhrchenwand verbliebene Aktivität im γ -Counter bestimmt.

Aus der Differenz der Aktivitäten vor und nach dem Waschen ließ sich die Menge des adsorbierten ^{125}J -Butx bestimmen.

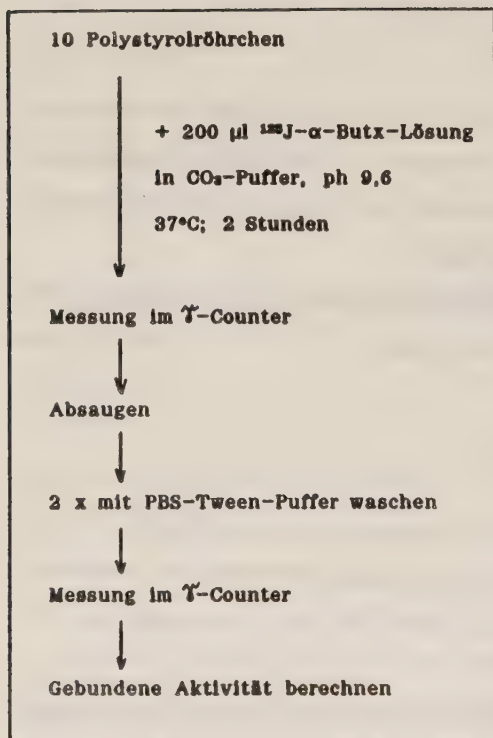


Abb.6: Schema der Pufferbeschichtungsmethode

III.3.1.3. Glutaraldehydmethode

Der Unterschied zur Pufferbeschichtungsmethode liegt in der Vorbehandlung der Plastikröhrchen mit Glutaraldehyd.

Die Polystyrolröhrchen werden zunächst mit einer 2% Lösung von Glutaraldehyd in Carbonatpuffer (pH 9,6) bei 56°C 2 Stunden inkubiert. Anschließend saugt man ab und wäscht 5 mal mit destilliertem Wasser. Die Röhrchen erscheinen nach dieser Behandlung leicht trübe.

Das weitere Vorgehen erfolgt analog des in III.3.1.2. beschriebenen Schemas.

Auch bei dieser Methode wurde die Aktivität der Röhrchen vor und nach dem Waschen bestimmt und die Menge des gebundenen ^{125}J - α -Butx errechnet.

Außerdem wurde noch die Abhängigkeit der Beschichtungsmenge von der Ausgangskonzentration des α -Butx untersucht (Abbildung 7). Hierzu wurden α -Butx-Lösungen mit steigenden Konzentrationen in den vorbehandelten Röhrchen inkubiert. Die gebundene Aktivität wurde wiederum im γ -Counter gemessen.

III.3.1.4. Auswertung

Mit der Pufferbeschichtungsmethode konnte eine Bindung von 1% ($c = 6 \mu\text{g/ml}$) bzw. von 1,6% ($c = 30 \text{ ng/ml}$) der inkubierten α -Butx-Menge erzielt werden. Dagegen betrug die Menge des gebundenen α -Butx nach Vorbehandlung der Röhrchen mit 2% Glutaraldehyd 43% ($c = 6 \mu\text{g/ml}$) bzw. 54,9% ($c = 30 \text{ ng/ml}$).

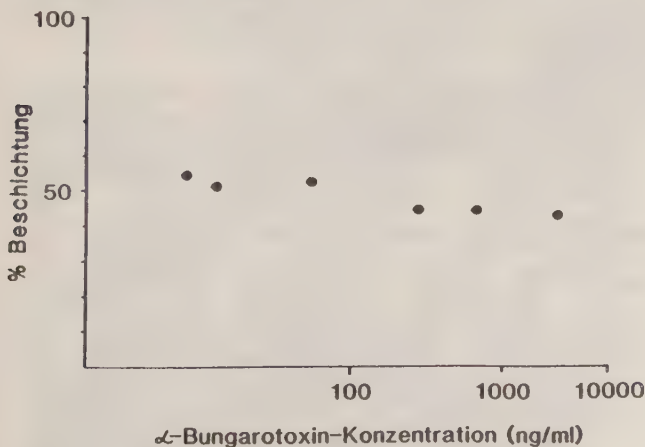


Abb.7: Beschichtung der vorbehandelten Röhrchen mit verschiedenen α -Butx-Konzentrationen

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit der Pufferbeschichtungsmethode eine zu geringe Proteinbeschichtung der Polystyrolröhrchen erreicht wurde. Die Beschichtung ließ sich durch Vorbehandlung der Röhrchen mit 2% Glutaraldehyd deutlich verbessern. Bei der für den ELISA geplanten Konzentration von 5 µg α -Butx/ml konnte eine sehr gute Ausgangskonzentration des α -Butx an der Röhrchenwand erzielt werden.

Die Röhrchenbeschichtung wurde von nun an unter Verwendung von käuflichem, nicht radioaktivem α -Butx vorgenommen.

Abbildung 8 und Abbildung 9 - 11 zeigen REM-Aufnahmen eines Polystyrolröhrchens nach Behandlung mit 2% Glutaraldehyd und nach Inkubation mit α -Butx.

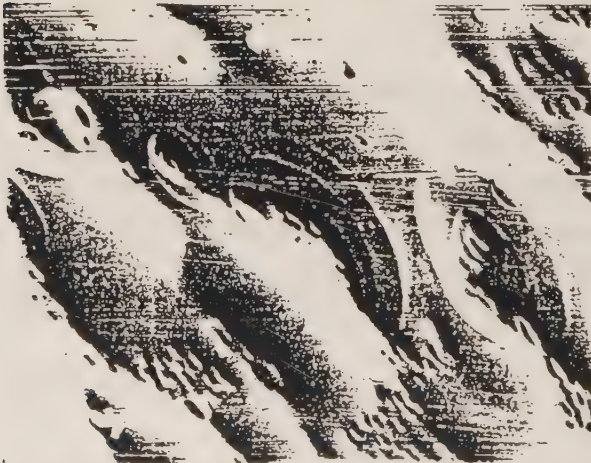


Abb.8: REM-Aufnahme eines Polystyrolröhrchens nach Behandlung mit 2% Glutaraldehyd

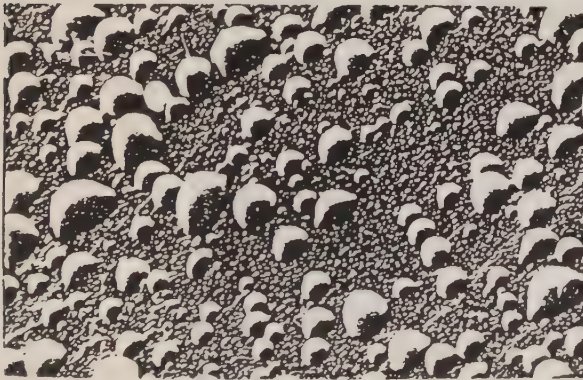
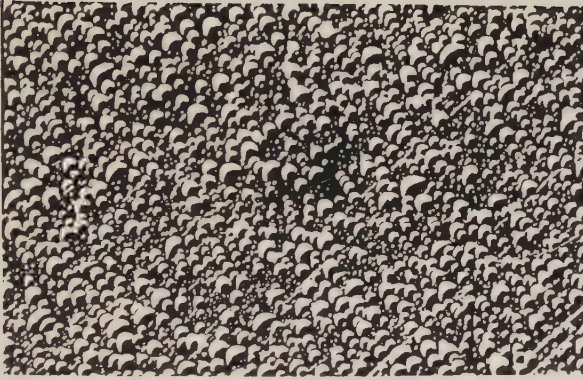


Abb.9 - 11: REM-Aufnahmen eines Polystyrolröhrchens nach Behandlung mit 2% Glutaraldehyd und Inkubation mit α -Butx

III.4. Durchführung des ELISA

Die mit α -Bungarotoxin (Konzentration 5 $\mu\text{g/ml}$) beschichteten Röhrchen wurden mit je 200 μl Humanmuskelextrakt bei 37°C zwei Stunden inkubiert. Die Konzentration des Acetylcholinrezeptors in diesem Muskelextrakt betrug circa 0,8 nMol α -Butx-bindende Stellen pro Liter.

Nach der Inkubation wurde abgesaugt und zweimal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen. Abbildung 12 zeigt eine REM-Aufnahme nach Inkubation mit AChR.



Abb.12: REM-Aufnahme eines Polystyrolröhrchens nach Inkubation mit 2% GA/ α -Butx/ AChR

Für die nun folgende Seruminkubation wurde Patientenserum mit bekannter AChR-Ak-Konzentration (RIA) eingesetzt. Das Serum wurde 1:40 mit PBS-Tween-Puffer verdünnt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Probenmenge betrug 200 µl; als Kontrolle diente ein Leerwert mit 200 µl Puffer. Spätere Versuche zeigten, daß eine Inkubation bei 37°C für 1 Stunde analoge Ergebnisse liefert.

Anschließend an die Seruminkubation wurde peroxidase-markiertes anti-human-IgG (Verdünnung mit PBS-Tween-Puffer) zugegeben und bei 37°C 1 Stunde inkubiert.

Die Antikörperverdünnung wurde solange variiert, bis bei der abschließenden Messung die Extinktionsänderungen bei einer AChR-Ak-Konzentration von 1 nmol/l im mittleren Meßbereich lagen.

Nach der Inkubation wurde zweimal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen und dann das Enzymsubstrat zugegeben und bei Raumtemperatur im Dunklen 30 Minuten stehengelassen. Nach Stoppen der Reaktion mit 0,5 N H₂SO₄ wurden die Extinktionen im Photometer bei 492 nm gegen den Leerwert gemessen.

Abbildung 13 zeigt die REM-Aufnahme eines Polystyrolröhrchens nach Durchführung des ELISA.

In Abbildung 14 ist eine typische Kurve zu sehen, die mit der ELISA-Methode erhalten wurde. Das Serum (c = 3,3 nmol/L) wurde mit PBS-Tween-Puffer fortlaufend verdünnt.

Die AChR-Ak-Konzentration wird in nmol α-Butx-bindende Stellen pro Liter angegeben.



Abb.13: REM-Aufnahme eines Polystyrolröhrchens nach Durchführung des ELISA

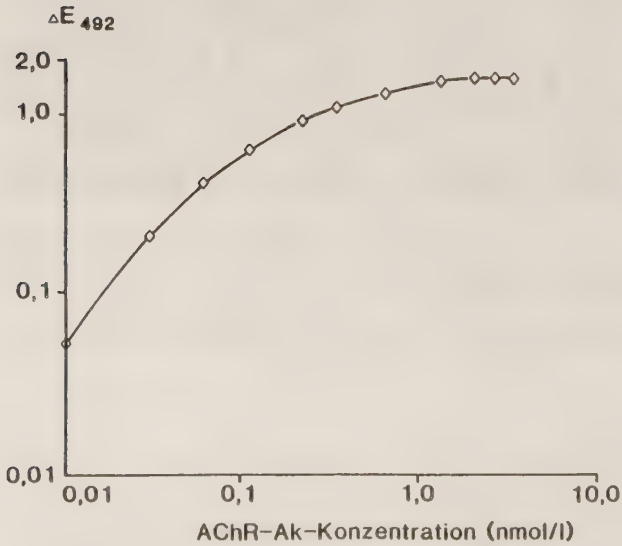


Abb.14: Typische ELISA-Kurve (Serumverdünnung;
AChR-Ak-Konzentration = 3,3 nmol/L)

Abbildung 16 zeigt zwei Kurven, bei denen verschiedene Konzentrationen des peroxidasemarkierten anti-human-IgG eingesetzt wurden.

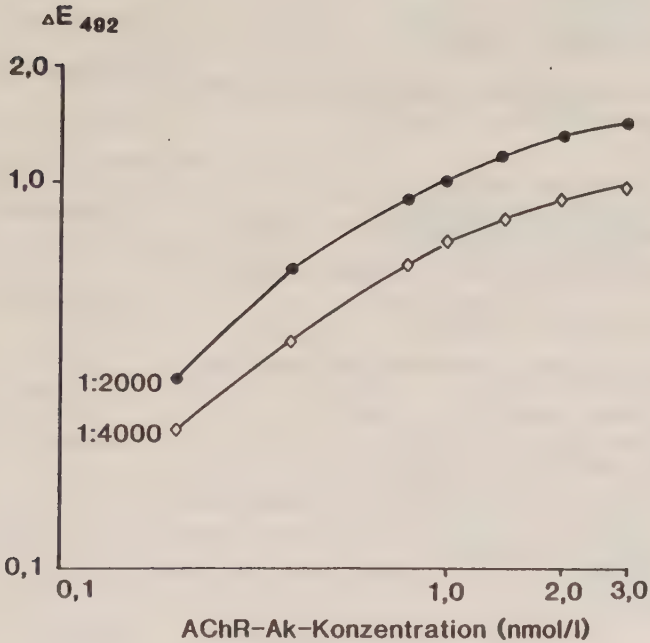


Abb.15: Einfluß der Konzentration des peroxidasemarkierten anti-human-IgG auf die Standardkurve

In Tabelle 2 sind nochmals sämtliche Arbeitsschritte der ELISA-Methode zusammengefaßt:

ELISA für AChR-Ak

- 1) Inkubation der Röhrchen mit 2% Glutaraldehyd, 56°C, 2h
- 2) Absaugen, 6 x mit aqua dest. waschen
- 3) Inkubation mit α -Butx, c = 5 $\mu\text{g/ml}$, CO_2 -Puffer pH 9,6:
je 200 μl , 2 h bei 37°C.
- 4) Absaugen, 2 x mit PBS_{Tw} waschen
- 5) Inkubation des AChR-haltigen Muskelextraktes, je 200 μl ,
2 h bei 37°C.
- 6) Absaugen, 2 x mit PBS_{Tw} waschen
- 7) Seruminkubation: je 5 μl Serumprobe + 200 μl PBS_{Tw};
über Nacht bei 4°C oder bei 37° 1 Stunde inkubieren
- 8) Absaugen, 2 x mit PBS_{Tw} waschen
- 9) Inkubation mit peroxidase-markiertem anti-human-IgG;
Verdünnung 1:2000 je 200 μl , 1 h, 37°C.
- 10) Absaugen, 2 x mit PBS_{Tw} waschen.
- 11) Zugabe von Enzymsubstrat, 30 min bei RT stehenlassen.
- 12) Zugabe von je 1 ml Stopplösung
- 13) E₄₉₂ bestimmen.

Tab.2: Arbeitsschritte des ELISA

Es wurden Doppelansätze für jedes Serum gemessen; als Leerwert diente ein Ansatz mit PBS_{Tw}-Puffer.

Die Ergebnisse und Daten der weiteren Austestung dieser Methode sind in Kapitel IV. zusammengestellt.

III.6. Materialien

125J-α-Bungarotoxin	NEN Radiochemicals, Boston, USA
α-Bungarotoxin	Firma Serva, Heidelberg
Polystyrolröhrchen	Firma Greiner, Nürtingen
(Immunolon, 2 ml)	
anti-human-IgG,	Firma Atab, Scarborough, USA
peroxidase markiert	
Chromogen POD	Behringwerke AG, Marburg
Enzygnost Substrat/Puffer	Behringwerke AG, Marburg
Glutardialdehyd	Firma Merck

Puffer:

- a) Carbonat-Puffer, pH 9,6: 5,04 g NaHCO_3 , mit aqua bidest.
auffüllen auf 1000 ml, mit 0,1 N NaOH auf pH 9,6 einstellen
- b) PBS-Tween-Puffer: 16g NaCl; 0,4g KH_2PO_4 ; 2,3g Na_2HPO_4 ;
1ml Tween 20; auf 2000 ml auffüllen, mit 0,1 N NaOH auf pH 7,4
einstellen.

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Standardkurve

Um die Ergebnisse eines ELISA-Testes auswerten zu können, ist es erforderlich, bei jedem einzelnen Testansatz eine Standardkurve mitzuführen.

Es ist nicht sinnvoll, anhand einer einmalig erstellten Bezugskurve die Werte anderer Testansätze abzulesen, da viele Faktoren das jeweilige Testergebnis beeinflussen, z.B.

- Qualität und Reproduzierbarkeit der Beschichtung
- Rezeptorqualität
- Lagerungsstabilität der Röhrchen, des Antiserums etc.

Somit kann es sein, daß die Standardwerte von Test zu Test etwas variieren; man kann die oben genannten Einflußgrößen korrigieren, wenn die gemessenen Werte anhand der jeweils mitgeführten Standardkurve abgelesen werden.

Um genügend Material für die Bezugskurve zu erhalten, wurden 83 Seren von Patienten mit gesicherter MG und mit niedrigem AChR-Ak-Titer (Immunpräzipitationsassay) gepoolt. Der AChR-Ak-Gehalt dieses Pools betrug nach der RIA-Methode 6,0 nmol/L.

Der Pool wurde mit PBS-Puffer 1:2 verdünnt ($c=2,0 \text{ nmol/L}$). Von dieser Ausgangskonzentration wurden mit PBS-Puffer stufenweise Verdünnungen bis zu einer Konzentration von $0,1 \text{ nmol/L}$ hergestellt.

Sechs Standardwerte wurden nun in jedem Test mitgeführt.

Abbildung 16 zeigt eine typische Bezugskurve für unseren ELISA.

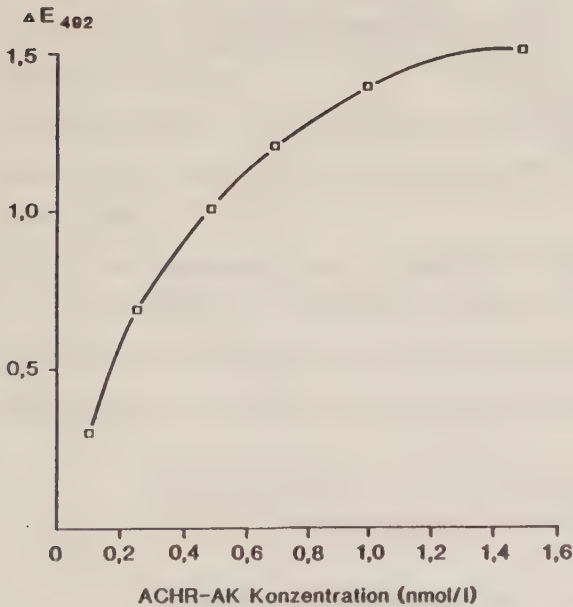


Abb.16: Typische Bezugskurve des entwickelten ELISA

Die Kurve wurde zweckmäßigerweise im linearen Maßstab aufgetragen, um die Ablesung der Probenwerte zu erleichtern.

In Abbildung 17 sind ELISA-Bezugskurven für drei verschiedene Testansätze zu sehen:

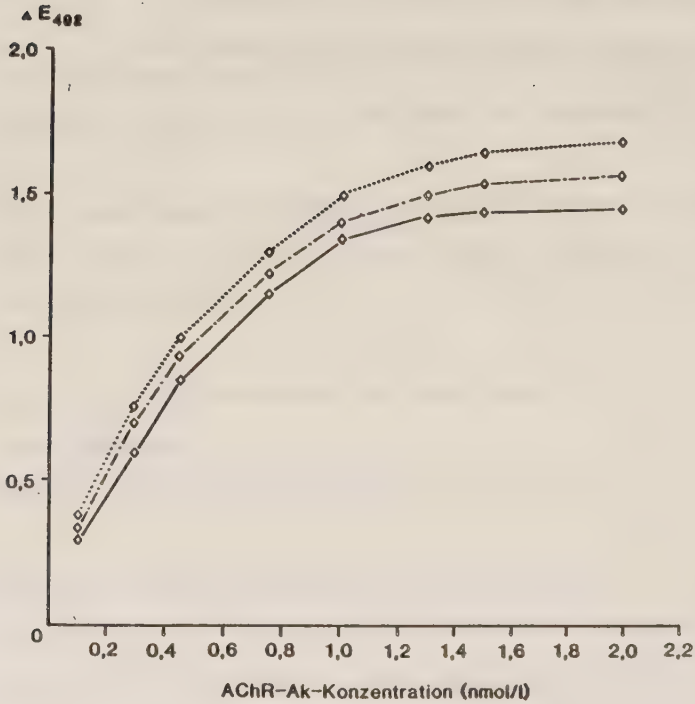


Abb.17: Standardkurven in drei verschiedenen Testansätzen

IV.2. Linearität und Meßbereich

Die dargestellte Kurve (Abb.16) ist typisch für einen ELISA. Mit höheren Konzentrationen nähert sich die Kurve asymptotisch einem Grenz-Extinktionswert, d.h. einem Sättigungsbereich.

Die Ursache für dieses Verhalten dürfte in der reaktionseigenen Enzymkinetik zu suchen sein.

Von Linearität läßt sich bei einer solchen Kurve höherer Ordnung nur sehr bedingt sprechen.

Entscheidend für die Interpretation gemessener Werte ist, daß diese in einem Bereich liegen, in dem die Steigung der Bezugskurve annähernd konstant ist.

Dies ist im Allgemeinen bis zu einer AChR-Ak-Konzentration von 1,0 nmol/L der Fall, mitunter auch bis zu maximal 1,5 nmol/L. Werte, die oberhalb dieses Bereiches liegen, müssen verdünnt werden, da sonst fälschlicherweise zu niedrige Werte bestimmt werden.

IV.3. Präzision

In Doppelansätzen wurde die Intra- und Interassay-Varianz in drei verschiedenen Konzentrationsbereichen bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

c (nMol/L)	SD (nMol/L)	VK %	n
0,5	0,069	13,1	10
1,0	0,109	11,24	10
1,5	0,21	15,5	10

Tab.3 : Intraassay-Varianz des ELISA

c (nMol/L)	SD (nMol/L)	VK %	n
0,5	0,065	11,97	6
1,0	0,088	8,63	6
1,5	0,084	5,46	6

Tab.4 : Interassay-Varianz des ELISA

IV.4. Störfaktoren

Es wurde die Beeinflussung der Ergebnisse durch Störfaktoren wie Bilirubin, freies Hämoglobin, EDTA und Heparin untersucht.

Für Bilirubin, freies Hb (Hämolyse) und EDTA konnte keine Beeinflussung festgestellt werden. Bei Heparin dagegen lagen die gemessenen Werte bis zu 90% unter denjenigen für Nativserum.

Abbildung 18 und 19 zeigen die Ergebnisse für die genannten Störfaktoren.

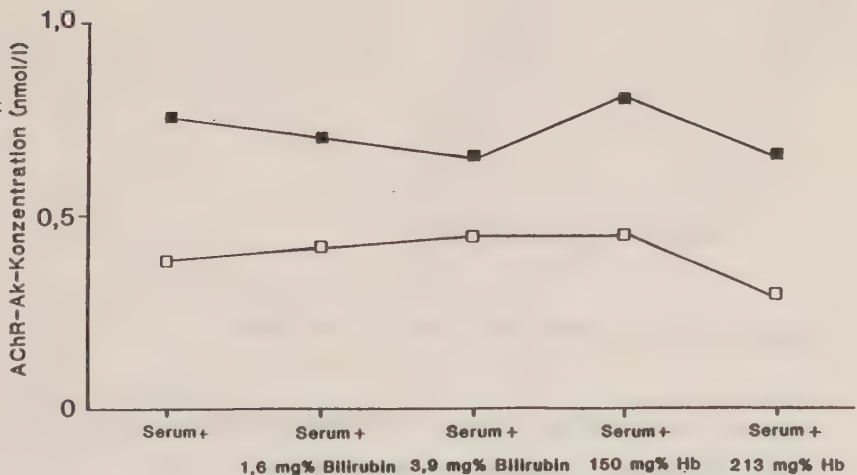


Abb.18: Einfluß von Bilirubin und Hämolyse auf den ELISA

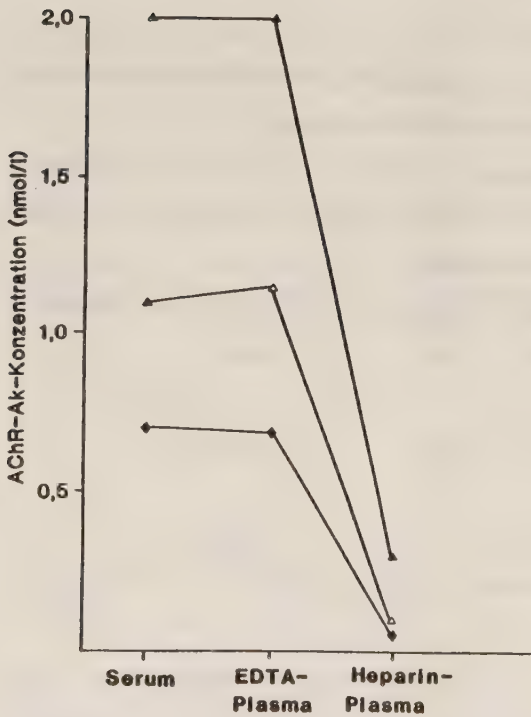


Abb.19: Einfluß von EDTA und Heparin auf den ELISA

Außerdem wurde festgestellt, daß auch lipämische Seren häufig falsch negative Resultate im Vergleich zum RIA erbringen.

Für den ELISA ist es also ratsam, Serumproben ohne Zusätze zu verwenden. Diese können bei -20°C jahrelang gelagert werden, auch wiederholtes Auftauen und Einfrieren beeinflusst die Ergebnisse nicht. Bei 4°C zeigt sich dagegen bereits nach wenigen Wochen ein Aktivitätsverlust.

IV.5. High-Dose-Hook-Effekt

Zur Erfassung des sogenannten High-Dose-Hook-Effektes wurde ein Serum, dessen Konzentration unverdünnt außerhalb des Meßbereiches lag (10,0 nmol/l), stufenweise mit PBS-Tween-Puffer verdünnt. Abbildung 20 zeigt die Verdünnungskurve für dieses Serum:

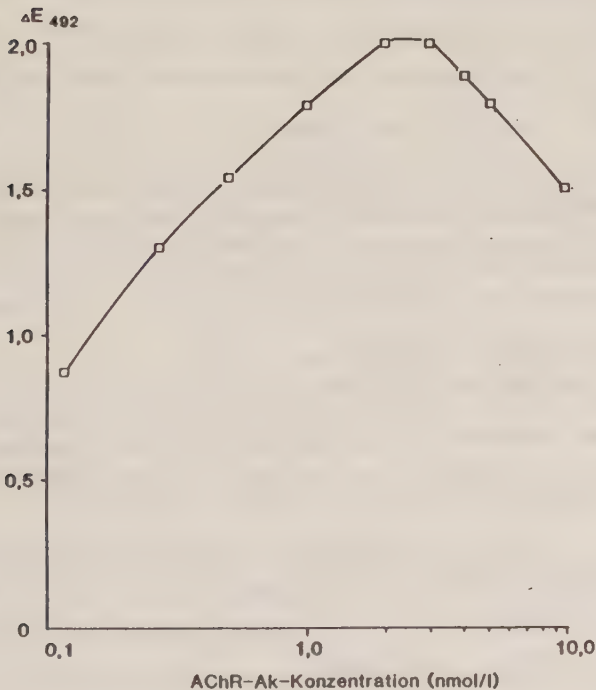


Abb.20: High-Dose-Hook-Effekt

Man sieht deutlich, daß mit ansteigender Konzentration zunächst eine Plateauphase erreicht wird, bei höheren Konzentrationen fallen die Werte dann wieder ab.

Für die Praxis bedeutet dieses Phänomen, daß ein Serum mit hoher Antikörper-Konzentration im Nativansatz falsch niedrige, möglicherweise sogar falsch negative Werte liefern kann, wenn nicht mehrere Verdünnungsstufen getestet werden.

Liegt bei zwei Verdünnungsstufen (z.B. 1:20; 1:100) der zweite Wert deutlich höher, so kann man davon ausgehen, daß man sich im Hook-Bereich einer solchen Kurve befindet.

Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, sollte ein unbekanntes Serum also immer in 2-3 Verdünnungsstufen getestet werden.

IV.6.Referenzbereich

Um den Referenzbereich festzulegen, wurden 20 Serumproben von klinisch und laborchemisch gesunden Personen, 25 Serumproben von Patienten ohne Muskelerkrankungen und 17 Serumproben von Patienten mit Muskelerkrankungen (jedoch keine MG) untersucht.

Bei den gesunden Personen und den Patienten ohne Muskelerkrankungen lagen die höchsten gemessenen Werte bei 0,08 nmol/L. Auch bei den Patienten mit Muskelerkrankungen lagen die beiden höchsten Werte bei 0,08 nmol/L.

Die obere Referenzbereichsgrenze wurde für den ELISA mit 0,1nmol/L festgelegt (RIA=0,4 nmol/L).

Als pathologisch gelten Werte $\geq 0,1$ nmol/L.

IV.7. AChR-Ak-Titer bei Patienten mit MG

Seren von 108 Patienten mit gesicherter MG (generalisiert und okulär) und bekanntem RIA-Titer wurden mit dem ELISA-Test gemessen (Abb.21). Bei der Auswahl der Seren wurde darauf geachtet, daß das Verhältnis positiver und negativer RIA-Titer in etwa der Sensitivität des RIA in einem großen Patientengut (ca.95%) entsprach.

98 Patienten hatten im RIA einen positiven Titer (0,43 - 51,4 nmol/L). Von 14 Patienten mit okulärer MG war ein Titer im RIA negativ.

Mit dem ELISA-Test konnte bei 86 Patienten (=81%) ein positiver Befund erhoben werden (0,1 - 23,0 nmol/L). Bei 22 Patienten war der Befund negativ (< 0,1 nmol/L). Bei den 14 Patienten mit okulärer MG wurden bei 4 Patienten negative Titer gemessen. Bei keinem Patienten, der im RIA einen negativen Befund hatte, konnten mit dem ELISA AChR-Ak nachgewiesen werden.

Innerhalb dieses willkürlich ausgewählten Patientenkollektivs läßt sich die diagnostische Zuverlässigkeit des ELISA-Tests im Vergleich zum Immunpräzipitations-Assay abschätzen.

Mit der ELISA-Methode wurde bei keinem der Patienten ein falsch positives Ergebnis erhalten, d.h. die Spezifität war bei den untersuchten Patienten 100%. Für die Sensitivität ergibt sich bei den untersuchten Patientenseren ein Wert von 81%.

Um endgültige Aussagen über Sensitivität, Spezifität und Predictive Value machen zu können, müssen diese Parameter an einem nicht ausgewählten Patientenkollektiv ermittelt werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß der ELISA ein empfindliches und sehr spezifisches Verfahren zur Bestimmung der AChR-Ak darstellt.

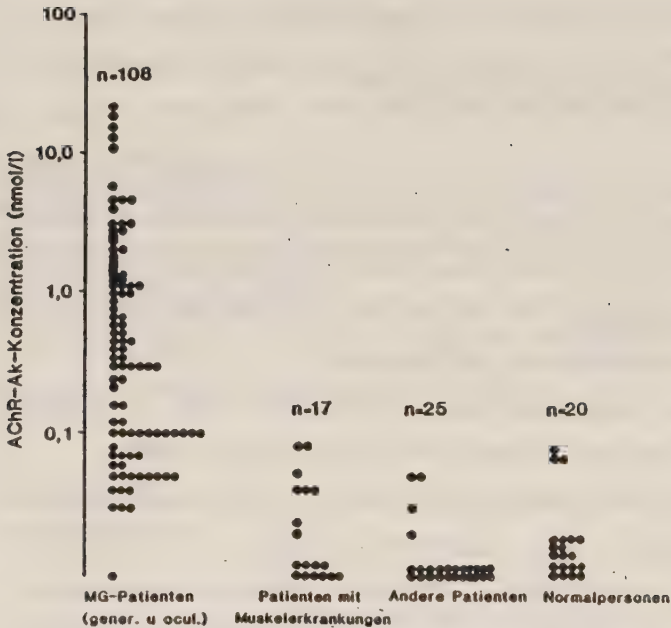


Abb.21: AChR-Ak-Titer bei Patienten mit MG, bei Patienten mit Muskelerkrankungen, bei Patienten ohne Muskelerkrankungen und bei Normalpersonen

IV.8. Methodenvergleich

Von den insgesamt 108 Patientenseren wurden 84 in die Berechnung zum Methodenvergleich einbezogen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Titerwerte zu erzielen, wurden Seren mit einem Titer $>3,0$ nmol/L nicht berücksichtigt.

Bei 84 Proben ergab sich zwischen dem Immunpräzipitationsassay und der ELISA-Methode eine Korrelation von 0,71 (Abb. 22).

Die Korrelationsgerade hat die Formel:

$$Y = - 0,238 + 0,79 X ;$$

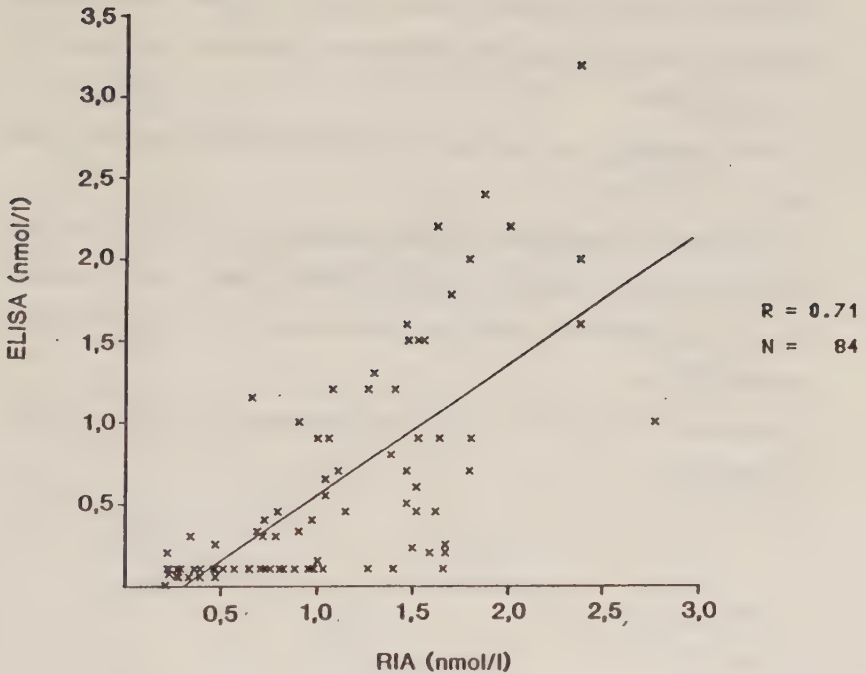


Abb.22: Methodenvergleich Immunpräzipitationsassay – ELISA

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, werden mit dem ELISA häufig niedrigere Werte als mit dem RIA gemessen.

In einigen Fällen konnte mit dem ELISA kein AChR-Ak-Titer nachgewiesen werden, obwohl der Titer im RIA positiv war. Auf dieses Phänomen wird in Kapitel V. näher eingegangen.

IV.9. Verlaufskontrollen

Für einen einzelnen Patienten besitzt weniger die Höhe eines einmalig gemessenen AChR-Ak-Titers als vielmehr der Titerverlauf eine wesentliche Aussagekraft.

Es wurde untersucht, ob auch mit dem ELISA Verlaufskontrollen möglich sind.

Da zwischen den Ergebnissen mit dem Immunpräzipitationsassay und den ELISA-Werten keine strenge Korrelation besteht, war es von Bedeutung, ob bei Verlaufskontrollen beide Methoden trotzdem gleichsinnige Titerbewegungen zeigen.

In Abbildung 23 bis 28 sind solche Verlaufskontrollen mit beiden Methoden dargestellt.

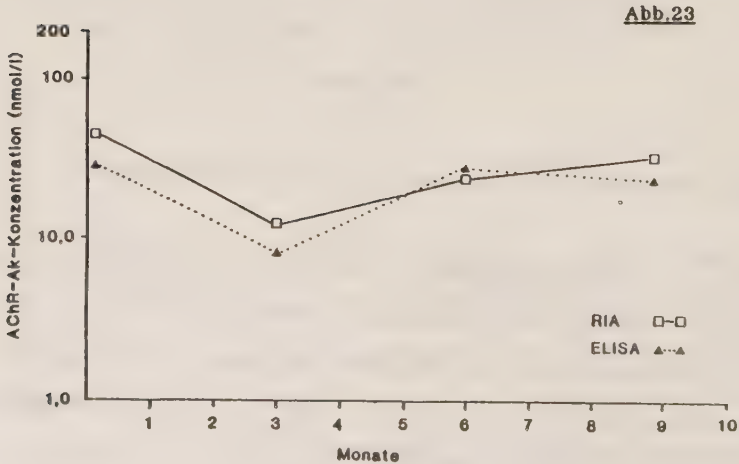


Abb.24

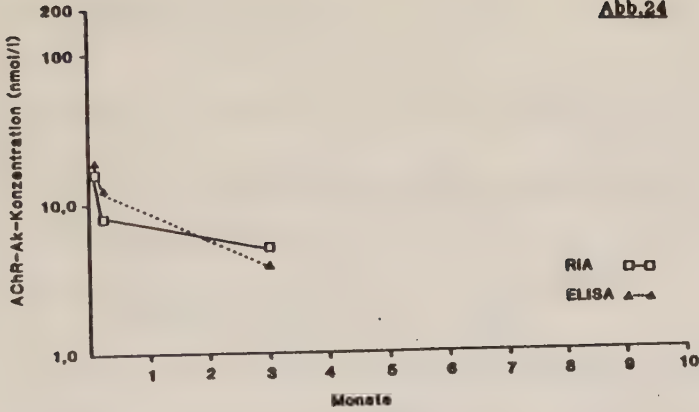


Abb.25

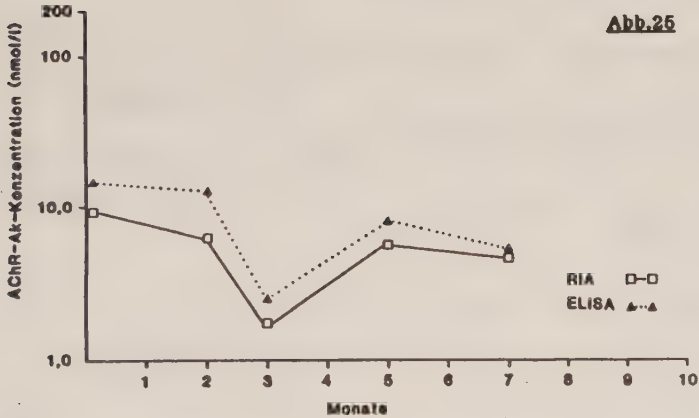
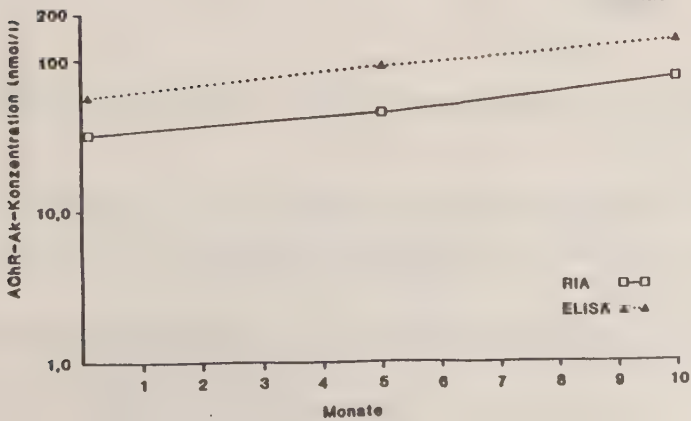


Abb.26



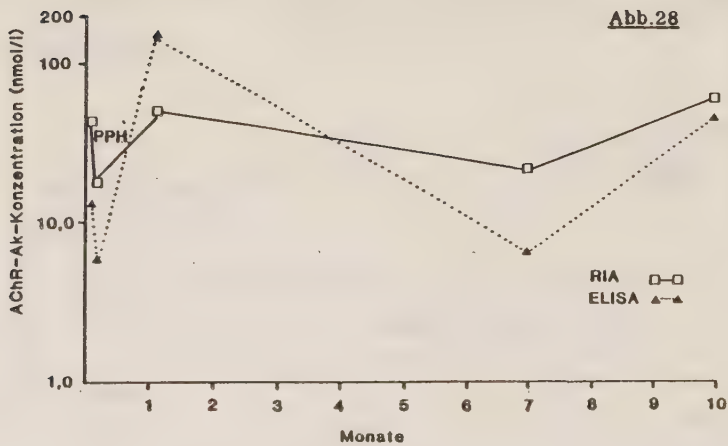
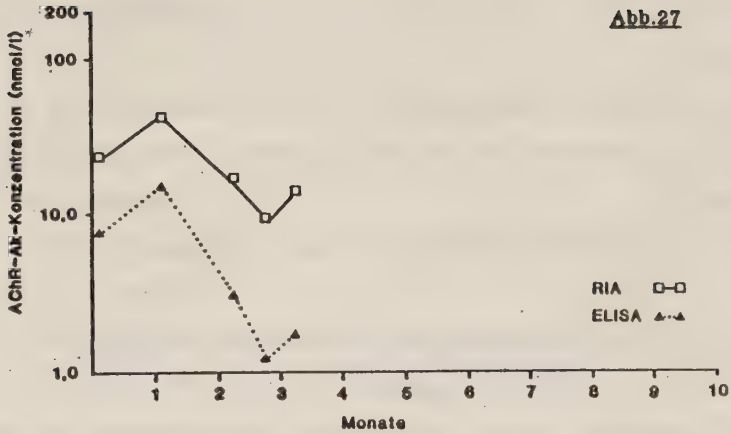


Abb. 23 - 28: Verlaufskontrollen der AChR-Ak-Titer bei MG-Patienten

Wie aus Abbildung 23 bis 28 hervorgeht, werden Titerbewegungen mit beiden Methoden identisch erfaßt, wobei die einzelnen Titerwerte differieren können.

Somit eignet sich auch der ELISA gut zur Verlaufskontrolle bei MG-Patienten.

IV.10. Haltbarkeit der Reagentien

In verschiedenen Testansätzen wurde die Haltbarkeit der beschichteten Röhrchen untersucht.

Die glutaraldehydbeschichteten Röhrchen lassen sich getrocknet bei 4°C bis zu 3 Monaten aufbewahren.

Nach Beschichtung mit α -Bungarotoxin können die Röhrchen circa 3-4 Wochen weiterverwendet werden (Lagerung bei 4°C).

Die Inkubation mit AChR dagegen sollte möglichst kurz vor dem geplanten Test erfolgen, da sich hier bereits innerhalb einer Woche Aktivitätsverluste zeigen (Abbildung 29).

Das peroxidasemarkierte anti-human-IgG konnte ca. 6 Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Sämtliche Lösungen (Puffer, α -Butx etc.) wurden mindestens einmal pro Monat frisch angesetzt.

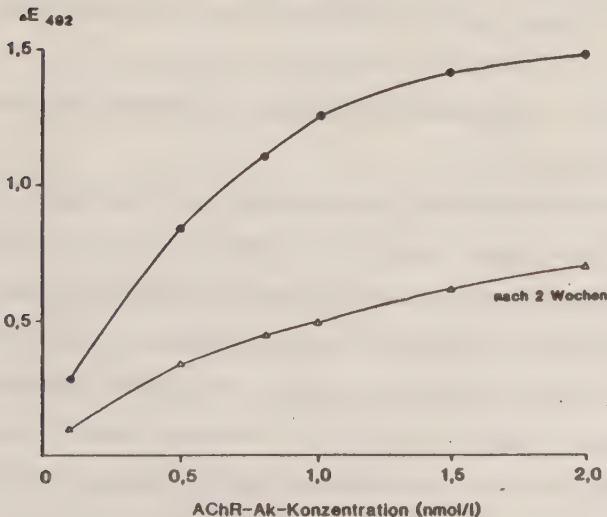


Abb.29: Aktivitätsverlust der AChR-beschichteten Röhrchen:
Standardkurve vor (●—●)
und nach 2-wöchiger Lagerung (△—△) der Röhrchen

V DISKUSSION

V.1. Methodischer Teil

Der Immunpräzipitationsassay ist eine hochspezifische und sensitive Methode zum Nachweis der AChR-Antikörper. Der wesentliche Nachteil dieser Methode liegt in der - im Vergleich mit anderen RIA-Methoden- hohen radioaktiven Belastung, die bei der routinemäßigen Durchführung dieses Tests auftritt.

1 ml ^{125}J -markiertes α -Bungarotoxin besitzt eine Gesamtaktivität von circa 350 μCi . Diese Menge ^{125}J - α -Butx reicht zur Markierung von 500 ml Rezeptor aus. Es errechnet sich für eine Probe (150 μl Rezeptor) eine Ausgangsbelastung von ca. 2800 Bequerel.

Diese hohe Belastung durch ionisierende Strahlung und die damit verbundenen Schutzmaßnahmen und die Schwierigkeiten bei der Entsorgung rechtfertigen den Aufbau und die Erprobung neuer, nicht-radioaktiver Testmethoden.

Als Alternative zum Radioimmunoassay bieten sich besonders enzymimmunologische Methoden an.

In der Literatur werden einige ELISA-Methoden zur Bestimmung der AChR-Antikörper beschrieben (5,16,17,18,21). Tabelle 5 zeigt eine Übersicht dieser Methoden. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, verwenden KOHLEISEN et al. sowie KAWANAMI et al. hochgereinigten humanen Rezeptor bei ihrem ELISA. Das Reinigungsverfahren ist für eine Routine-methode zu aufwendig, zumal die Ausbeute an isoliertem Rezeptor relativ gering ist. DWYER et al. binden den Rezeptor mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen Rattenmuskulatur an Polyvinylplatten.

NORCROSS et al. adsorbieren α -Bungarotoxin auf Mikrotiterplatten, inkubieren AChR vom Torpedofisch und verwenden antikörperhaltiges Serum von Ratten. Bei den beiden letztgenannten Methoden ist keine Reinigung des Muskelextraktes erforderlich, da der AChR selektiv an die Festphase gebunden wird. KOBAYASHI et al. binden einen ungereinigten, AChR-haltigen Rattenmuskelextrakt direkt an Mikrotiterplatten. Bei dieser Methode ist nicht auszuschließen, daß außer dem AChR auch andere Proteine unspezifisch an der Plastikoberfläche gebunden werden. FURUKAWA et al. schließlich beschreiben einen Enzym-Präzipitationsassay (10).

Keine der genannten Methoden hat sich zur routinemäßigen Bestimmung der AChR-Ak allgemein durchgesetzt.

Die Gründe dafür sind u.a.:

- a) keine der Methoden wurde anhand eines größeren Patientenkollektives evaluiert
- b) monoklonale Antikörper sind nicht allgemein zugänglich
- c) Rattenmuskelextrakt ist zum Nachweis humaner AChR-Ak weniger geeignet als Humanmuskelextrakt (hohe unspezifische Bindung normaler Antikörper an Rattenrezeptor) (3)
- d) die Reinigung humanen AChR-Extraktes ist für ein Routineverfahren zu aufwendig
- e) einige der beschriebenen Methoden sind wenig praktikabel

Aus diesen Gründen haben wir einen einfach zu handhabenden ELISA-Test entwickelt, der mit ungereinigtem, humanen Muskelextrakt als Antigensubstrat arbeitet. Dieser Test wurde methodisch evaluiert und auf seine klinische Verwendbarkeit hin untersucht.

Als Vergleichsmethode diente der Immunpräzipitationsassay, da wir diesen Test in unserem Institut routinemäßig durchführen und Ergebnisse für eine große Patientenzahl vorliegen (8).

AUTOR	METHODE	PAT. ZAHL	SENSIT.	ANMERKUNG	LIT.
MORTROSE	ACHR vom Torpedofisch wird via s-Butx an Mikro-titerplatten gebunden Ratten-anti-ACHR-Serum			nicht Ratten-ACHR-Ak bei EAMG	21
KOBAYASHI	Rattenmuskelextrakt wird ungereinigt auf Mikro-titerplatten adsorbiert	34	910	Vergleichsmethode RIA nur Sensitivität 850; hohe Sens. trotz unger. Rattenmuskel-extrakt schlecht erklärbar; unspezifische Bindungen?	17
DWYER	Ratten/Human-ACHR wird via monoklonaler Ak auf Mikro-titerplatten adsorbiert	10	800	aufwendige Methode	5
KAMAKAWI	gereinigter ACHR vom Kalbs-thymus bzw. humaner ACHR wird auf Mikrotiterplatten adsorbiert	31	740	aufwendige Methode	16
KORLEISEN	Mikrotiterplatten werden mit hochgereinigtem humanen ACHR beschichtet	10	?	aufwendige Methode	18

Tab.6: Übersicht der in der Literatur beschriebenen Enzymimmunoassays zur Bestimmung der AChR-Ak

Präzision, Linearität und Meßbereich

Die Intra- und Interassay-Varianz des ELISA-Tests liegt zwischen 11,2 und 16,5% bzw. zwischen 5,5 und 12% (RIA: Intraassay ca.5%; Interassay 7,5 - 12,6%, (11)). Der hohe Intraassay-Vk von 16,5% wurde bei einer AChR-Ak-Konzentration von 1,5 nmol/L im Nativansatz ermittelt. In diesem Bereich ist die Standardkurve bereits relativ flach und der Ablesefehler wird größer. Legt man den Meßbereich bis 1,0 nmol/L fest, so ergibt sich ein maximaler Intraassay-VK von 11,2 %. Eine Verbesserung der VKs ließe sich eventuell noch durch eine automatisierte Röhrchenbeschichtung und durch eine linearisierte Standardkurve (26) erzielen .

Entsprechend dem linearen Bereich der Standardkurve wurde der Meßbereich des ELISA bis 1,0 nmol/L festgelegt. Werte, die oberhalb dieses Bereiches liegen, müssen verdünnt werden, da sonst zu niedrige Werte bestimmt werden. Die Verhältnisse beim RIA sind analog.

Referenzbereich

Aufgrund der Ergebnisse von Serumproben von 20 klinisch und laborchemisch gesunden Personen, 25 Patienten ohne Muskelerkrankungen und 17 Patienten mit Muskelerkrankungen (keine MG) wurde die obere Referenzbereichsgrenze bei 0,1 nmol/L festgelegt. Verglichen mit dem RIA (0,4 nmol/L) liegt die Grenze somit deutlich niedriger. Der Grund hierfür könnte sein, daß der "Rauschpegel" beim ELISA niedriger als beim RIA ist, d.h., daß weniger unspezifische Aktivität gemessen wird. In der Literatur sind leider für die meisten bisher publizierten Methoden keine eindeutigen Referenzbereichsgrenzen angegeben. Nur FURUKAWA und KOBAYASHI geben obere Referenzbereichsgrenzen mit 0,47 bzw. 0,31 nmol/L an; diese Werte liegen deutlich oberhalb unseres Wertes.

Methodenvergleich

Die Korrelation zwischen ELISA und RIA ($R=0,71$) ist als mittelmäßig einzustufen. Die gemessenen Titerwerte liegen beim ELISA häufig etwas niedriger als beim RIA, doch läßt sich daraus keine allgemeine Regel ableiten.

Ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Korrelation zwischen beiden Verfahren ist folgender: der ELISA hat keine eigene Bezugsskala, sondern führt eine Bezugskurve mit, die auf gemessenen RIA-Werten beruht. Somit geht in die Fehler- und Korrelationsbetrachtung des ELISA zwangsläufig der Fehler des RIA mit ein. Selbst innerhalb des RIA können Werte, die mit unterschiedlichen Rezeptorchargen gemessen wurden, nicht unmittelbar miteinander verglichen werden, sondern müssen einen Umrechnungsfaktor berücksichtigen.

Die Schwierigkeit bei allen bisher beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der AChR-Ak liegt darin, daß der Aufbau eines standardisierbaren Tests nicht möglich ist, solange noch keine monoklonalen, antidiotypischen Antikörper verfügbar sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Korrelation zwischen beiden Methoden der Erwartung entspricht. Die mittelmäßige Korrelation ist zum Teil durch die unterschiedlichen Prinzipien beider Methoden (Präzipitation vs. Festphasenreaktion) zu erklären.

Praktikabilität

Der ELISA ist einfach und schnell durchzuführen. Im Vergleich zum Immunpräzipitationsassay ergeben sich folgende Vorteile:

- a) keine Gefährdung durch radioaktive Strahlung
- b) keine besonderen Schutzmaßnahmen erforderlich
- c) keine gesonderte Abfallsammlung und -lagerung
- d) längere Haltbarkeit der Reagentien (keine Radiolyse)
- e) geringer apparativer Aufwand: für den ELISA werden nur einfache Wasch- und Absaugvorrichtungen sowie ein Photometer benötigt.

Das Ergebnis eines ELISA-Tests läßt sich innerhalb eines Arbeitstages ermitteln, da die Inkubationszeiten kurz sind. Wahlweise kann die Seruminkubation über Nacht bei 4°C oder bei 37°C für 1 Stunde erfolgen. Hierdurch läßt sich der Test dem jeweiligen Tagesplan gut anpassen. Die Vorbereitung der Röhrchen kann unabhängig vom Testansatz "auf Vorrat" erfolgen, lediglich der letzte Schritt, die AChR-Inkubation, sollte möglichst nicht früher als 1-2 Tage vor Testdurchführung angesetzt werden. Als reine Arbeitszeiten errechnen sich für den ELISA für die Röhrchenvorbereitung ca. 45 Minuten und für die Testdurchführung (20 Doppelansätze) ca. 80 Minuten (Tabelle 6).

Röhrchenvorbereitung (100 Röhrchen):

GA pipettieren	5	Minuten
Absaugen/Waschen	10	"
α -Butx pipettieren	5	"
Absaugen/Waschen	10	"
AChR pipettieren	5	"
Absaugen/Waschen	5	"

Gesamt **ca. 45 Minuten**

Test (50 Röhrchen):

Serum sortieren,		
verdünnen, pipettieren	30	Minuten
Absaugen/Waschen	10	"
Antiserum pipettieren	5	"
Absaugen/Waschen	5	"
Substrat zugeben	5	"
Reaktion stoppen	5	"
Messung (manuell)	15	"

Gesamt **ca. 80 Minuten**

Tab.6: Aufschlüsselung der Arbeitszeit beim ELISA

V.2. Klinischer Teil

Sensitivität und Spezifität

Der ELISA-Test ist ebenso wie der RIA-Test hochspezifisch für AChR-Antikörper. Bei keinem der Nicht-MG-Patienten ($n=62$) wurde mit dem ELISA ein falsch positiver Befund erhoben. Innerhalb eines ausgewählten Patientenkollektivs von MG-Patienten ($n = 108$) lag die Sensitivität des ELISA bei 81 % (RIA 91%). Bei einigen Patienten konnten trotz positivem RIA-Befund mit dem ELISA keine AChR-Ak nachgewiesen werden. Die Ursache für die geringere Sensitivität des ELISA liegt möglicherweise darin, daß bei der Bindung des AChR an eine Festphase via α -Bungarotoxin eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls auftritt, die dazu führt, daß bestimmte Unterklassen der Antikörper nicht mehr gebunden werden können und somit nicht erfaßt werden (14).

Außerdem ist der ELISA für Störeinflüsse etwas anfälliger als der RIA. So konnte beispielsweise in Plasmaphereseproben mit dem ELISA kein positiver Befund erhoben werden, obwohl die Titer im RIA eindeutig positiv waren. Der Grund hierfür ist der Heparinzusatz bei Plasmapheresetherapie, wodurch der ELISA erheblich gestört wird.

Die Tatsache, daß bei einigen Patienten weder mit dem RIA noch mit dem ELISA AChR-Antikörper nachgewiesen werden können, kann verschiedene Ursachen haben:

- a) es sind Ak vorhanden, die mit keinem der beiden Testsysteme erfaßt werden
- b) die Bindung der Ak an den AChR liegt im Bereich der α -Butx-Bindungsstelle (31)
- c) es könnte sich um MG-Sonderformen handeln, bei denen AChR-Ak keine pathogenetische Bedeutung haben (34).

Insgesamt ist die Sensitivität des ELISA-Tests mit 0,81 als gut zu bewerten. An größeren Patientenzahlen muß sich zeigen, ob sich dieser Wert an einem nicht ausgewählten Patientenkollektiv bestätigt.

Verlaufskontrollen

Die Bestimmung der AChR-Ak ist ein wichtiges Kriterium bei der Verlaufs- und Therapiekontrolle bei MG-Patienten (8).

Mit dem RIA und dem ELISA lassen sich bei Verlaufskontrollen gleichsinnige Titerbewegungen nachweisen.

Hierbei findet sich keine strenge Korrelation, was die Titerhöhe anbelangt; in einigen Fällen liegen die ELISA-Werte oberhalb der RIA-Werte, in anderen Fällen ist die Situation umgekehrt.

Da die absolute Titerhöhe für den einzelnen Patienten weniger aussagekräftig ist als Titterschwankungen im Krankheitsverlauf (9), eignet sich der ELISA-Test ebenso wie der RIA ausgezeichnet zur Verlaufs- und Therapiekontrolle bei MG-Patienten.

Für die Praxis ist es wichtig, daß bei der Verlaufskontrolle eines einzelnen Patienten immer dieselbe Methode zur Bestimmung der AChR-Ak verwendet wird, bei einem Wechsel der Methode muß der Vorwert mitbestimmt werden.

Die hier beschriebene enzymimmunologische Methode stellt aufgrund der dargestellten Ergebnisse eine hochspezifische, sensitive und einfach zu handhabende Methode zur Bestimmung der AChR-Ak dar und eignet sich ausgezeichnet zur Diagnose und Verlaufskontrolle bei MG-Patienten.

Die wichtigsten Daten von ELISA und RIA sowie Vor- und Nachteile beider Methoden sind nochmals übersichtlich in Tabelle 7 zusammengefaßt.

	ELISA-Test	Immunpräzipitationsassay
Spezifität	1.0	1.0
Sensitivität	0.81	0.91
Intrassay-VK	11.2 - 15.5 %	ca 5.5 %
Interassay-VK	5.5 - 12.0 %	7.5 - 12.6 %
Vorteile	Kurze Inkubationszeiten, schnelle Befunderhebung, keine radioaktive Belastung, evtl. Umstellung auf automatische Auswertung möglich	Hohe Sensitivität (96% bei großem Patientenkollektiv); gute Präzision
Nachteile	Geringere Sensitivität als RIA, Röhrchenbeschichtung nicht exakt kontrollierbar, höhere Störanfälligkeit, nicht standardisierbar	Hohe radioaktive Belastung, spezielle Abfallbeseitigung erforderlich, nicht standardisierbar

Tab.7: Gegenüberstellung der wichtigsten Daten von ELISA und RIA

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine Autoimmunerkrankung, die zu Schwäche und abnormer Ermüdbarkeit der Muskulatur führt. Pathogenetisch liegt dieser Erkrankung die Bildung autoimmuner Antikörper zugrunde, die gegen den postsynaptischen Acetylcholinrezeptor gerichtet sind.

Es kommt zu einer Verminderung der funktionsfähigen Acetylcholinrezeptoren und somit zu einer Störung der neuromuskulären Übertragung.

Die Acetylcholinrezeptor-Antikörper (AChR-Ak) lassen sich bei ca. 96% der MG-Patienten im Serum nachweisen.

Derzeit wird zum Nachweis der AChR-Ak zumeist ein Immunpräzipitationsassay (RIA) verwendet. Der Nachteil dieser Methode liegt in der hohen radioaktiven Belastung, die bei der routinemäßigen Durchführung dieses Tests auftritt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen enzymimmunologischen Test zum Nachweis der AChR-Ak zu entwickeln und im Hinblick auf eine routinemäßige Anwendung zu evaluieren.

Das Prinzip des ELISA besteht darin, daß AChR aus humanem Muskelextrakt mittels α -Bungarotoxin selektiv an eine Festphase gebunden wird. Wichtig ist hierbei, daß durch Vorbehandlung der Festphase eine ausreichende Ausgangskonzentration des α -Bungarotoxin an der Plastikmatrix erzielt wird.

Nach Zugabe des Patientenserums binden sich die Antikörper an den AChR. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt mit Hilfe von peroxidasemarkiertem anti-human-IgG.

Nach Zugabe eines entsprechenden Enzymsubstrates wird die Extinktion der farbigen Lösungen bei 492 nm gemessen.

Die Differenz zwischen gemessenem Wert und Leerwert ($= \Delta E$) ist proportional zur Menge der Antikörper im Patientenserum.

Der lineare Bereich der ELISA-Methode liegt zwischen 0 und 1,0 nmol/L; der Meßbereich dieser Methode wurde analog festgelegt.

Die obere Referenzbereichsgrenze liegt beim ELISA bei 0,1 nmol/L. Die Berechnung der Ak-Titer erfolgt anhand einer mitgeführten Bezugskurve.

Die Methode wurde im Hinblick auf Präzision, Störfaktoren, High-Dose-Hook-Effekt etc. evaluiert. In Bezug auf die Präzision ist die ELISA-Methode durchaus mit anderen Methoden vergleichbar. Der ELISA ist etwas störanfälliger als der RIA; vor allem Heparin beeinflusst die Untersuchungsergebnisse stark.

Es wurden 108 Seren von Patienten mit gesicherter MG und bekanntem RIA-Titer untersucht. Bei 81% dieser Patienten konnte mit dem ELISA ein positiver Befund erhoben werden. Bei einer Kontrollgruppe (n=62), die aus Normalpersonen und Patienten ohne bzw. mit neuromuskulären Erkrankungen (keine MG) bestand wurde kein einziger falsch positiver Befund ermittelt.

Mit dem hier vorgestellten ELISA und dem RIA wurden bei MG-Patienten im Krankheitsverlauf identische Titterschwankungen festgestellt.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, daß der ELISA ein empfindlicher und hochspezifischer Test zur Bestimmung der AChR-Ak ist und sich gut zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der MG eignet.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Almon, R.R., Appel, C.G.
Interaction of myasthenic serum globuline with the acetylcholine receptor
Biochem. Biophys. Acta 393, 66-77 (1975)
- 2) Barrett, M.J.
Covalently bound biological substances to plastic materials and use in radioimmunoassay
US Patent 4, 001, 583 (1977)
- 3) Brenner, T., Zwelman, B., Abramsky, O. et al.
Radioimmunoassay of antibodies to acetylcholine receptor in serum of myasthenia gravis patients
Isr.J.Med.Sci. 14, 986-989, 1978
- 4) Cantarero, L.A., Butler, J.E.
Anal.Bioch. 105, 375 (1980)
- 5) Dwyer, D.S., Bradley, R.J., Urquhart, C.K., Kearney, J.F.
An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibodies against muscle acetylcholine receptor
J. Immun. Meth. 57, 111-119, 1983

- 6) Engel, A.G. et al.
Ultrastructural localisation of the acetylcholine receptor in myasthenia gravis and its experimental autoimmune model
Neurology (Minneap.) 27, 307-316, 1977

- 7) Engvall, E., Perlman, P.
Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA III:
Quantitation of specific antibodies by enzyme labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.
J.Immunol. 109, 125-135, 1972

- 8) Fateh-Moghadam, A.
Die Bedeutung der Acetylcholinrezeptor-Antikörper für die Pathogenese, Diagnostik und Verlaufskontrolle der Myasthenia gravis
Dt.Ges. f. Klin.Chemie e.V., Mitteilungen 3186, 111-112, 1986

- 9) Fateh-Moghadam, A., Besinger, U., Schumm, F., Toyka, K.V., Witt, Th.
Stellenwert der Acetylcholinrezeptor-Antikörper-Bestimmung in Therapie, Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der Myasthenia gravis
Münchn.Med.Wschr. 126, 44, 1285-1286 (1984)

- 10) Furukawa, S., Akazawa, S., Furukawa, Y. et al.
A practical enzyme immunoassay for anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis
J. of Neuroimm. 6, 397-409 (1984)

- 11) Heininger, K.
 Stellenwert der Bestimmung der AChR-Ak in der Diagnostik und
 Verlaufsbeurteilung der Myasthenia gravis
 Dissertation 1986, LMU München

- 12) Hohlfeld, R., Wekerle, H.
 Myasthenia gravis. Prototyp einer Anti-Rezeptor-
 Autoaggressionserkrankung
 Münchn.Med.Wschr. 123, 31, 1207-1211, 1981

- 13) Kalles, J., Heinz, F., Kaschka, W.P., Druschky, K.-F., Kalden, J.R.
 Heterogenität von Acetylcholinrezeptor-Antikörpern bei Myasthenia
 gravis-Patienten
 Klin.Wschr. 62, 377-385, 1984

- 14) Kalles, I., Heinz, F., Hohlfeld, R., Wekerle, H. et al.
 Physicochemical and immunological properties of acetylcholine
 receptors from human muscle
 Mol.Cell.Biochem. 64, 69-72, 1984

- 15) Kao, J., Drachman, D.B.
 Myasthenic immunoglobulin accelerates acetylcholine receptor
 degradation
 Science 196 527-529, 1977

- 16) Kawanami, S., Rieko, T., Kenichiro, O.
 Enzyme-linked Immunosorbent assay for antibody against the
 nicotinic AChR in human Myasthenia gravis
 Ann.of Neurology, Vol.15, Nr.2, 195-200, 1984

- 17) Kobayashi, N., Sugita, H. et al.
**A Solid Phase Immunoassay for Anti-Acetylcholine-Receptor
 Antibody in Myasthenia gravis Patients**
 J.of Imm. Meth. 73, 267-272, 1984

- 18) Kohlsens, B., Kalles, I., Kalden, J.R.
**ELISA zum Nachweis von AChR-Ak im Serum von Myasthenia
 gravis-Patienten**
 In: Jerusalem (Hrsg.): Fortschritte der Myologie, Band VII, Freiburg,
 Dt.Ges. zur Bekämpfung der Muskelkrankheiten, 147-153, 1984

- 19) Lindström, J.M., Seybold, M.E., Lennon, V.A., Whittigham, S., Duane, D.
**Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis:
 prevalence, clinical correlates and diagnostic value**
 Neurology (Minneap.) 26, 1054-1059, 1976

- 20) Mittag, T., Kornfeld, P., Tormay, A., Woo, C.
**Detection of anti-acetylcholine receptor factors in serum and
 thymus from patients with myasthenia gravis**
 N.Engl.J.Med. 294, 691-694, 1976

- 21) Norcross, N.L., Griffith, I.J., Lettieri, J.A.
**Measurement of Acetylcholine Receptor and Anti-Receptor
 Antibodies by ELISA**
 Muscle and Nerve 3, 325-349, 1980

- 22) Osserman, K.E.
"Myasthenia gravis"
 Grune and Stratton, New York, 1958

- 23) Parsons, J.H.Jr.
 Antibody coated plastic tubes in radiolimmunoassay
 In: Sydney + Kaplan (Hrsg.), **Methods in Enzymology**,
 Bd.73, 224-244, 1981

- 24) Patrick, J., Lindström, J.
 Autoimmune response to acetylcholine receptor
 Science 180, 871-872, 1973

- 25) Pesce, A.J., Ford, D.J., Galzutis, M.A.
 Qualitative and quantitative aspects of Immunoassays
 Scand.J.Immun., Vol. 8, Suppl. 7, 1-6, 1978

- 26) Sandel, P., Vogt, W.
 Rechnerunterstützte Ergebnismwertberechnug bei Enzymimmunoassays
 In: Enzymimmunoassay, Hrsg. W.Vogt, Thieme Verlag Heidelberg,
 Seite 4-8, 1978

- 27) Schuurs, A.H., van Weemen, B.K.
 Enzym-Immunoassay
 Clin.Chem.Acta 81, 1-40, 1977

- 28) Schumm, F., Fateh-Moghadam, A., Dichgans, J.
 Korrelation von AChR-Ak und klinischem Schweregrad der
 Myasthenia gravis unter kombinierter immunsuppressiver Therapie
 Eur.Arch. Psych.Neurol.Sci. 234, 224-230, 1984

- 29) Simpson, J.A.
 Myasthenia gravis. A new hypothesis
 Scott.Med.J. 5, 419-436, 1960

- 30) Sugiyama, H., Benda, P., Meunier, J., Changeux, J.P.
 Immunological characterisation of the cholinergic receptor protein
 from Electrophorus electricus
 FEBS Lett. 35, 124-128, 1973

- 31) Toyka, K.V., Drachman, D.B., Griffin, J.P. et al.
 Myasthenia gravis: Study of humoral immune mechanisms by passive
 transfer to mice
 N.Engl.J.Med. 196, 125-131, 1977

- 32) Toyka, K.V., Drachman, D.B., Pestronk, A., Kao, J.
 Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse
 Science 190, 397-399, 1975

- 33) Vincent, A., Newson-Davis, J.

**Alpha-Bungarotoxin and anti-acetylcholine receptor antibody
binding to human acetylcholine receptor**

In: Ceccarelli, B., Clementi, F. (eds.): **Advances in
Cytopharmacology, Neurotoxins-Tools in Neurobiology Vol.3,**
New York, Raven, 267-278, 1979

- 34) Vincent, A., Newson-Davis, J.

**Absence of anti-acetylcholine receptor antibodies in congenital
form of myasthenia gravis**

Lancet i , 441-442, 1979

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Universität München (Direktor: Prof.Dr.M.Knedel) angefertigt.

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit am Institut für Klinische Chemie sowie für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Professor Knedel.

Herrn Professor Dr.A.Fateh-Moghadam möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Anregungen während der Durchführung der Arbeit herzlich danken.

Ich möchte allen Assistentinnen des Bereichs Immunologie , insbesondere aber Frau M. Alblez und Frau A. Hoegg, für die Unterstützung bei der Arbeit danken.

LEBENS LAUF

8.1.1956	geboren in München als Tochter des Dipl.Ing Hermann Lawaldt und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Nußbickel
1962 - 1966	Volksschule an der Werdenfelsstraße, München
1966 - 1976	Sozialwiss. Käthe-Kollwitz-Gymnasium, München
21.6.1975	Abitur
1975 - 1981	Chemiestudium an der LMU München
24.7.1980	Diplom-Hauptprüfung
1980 - 1981	Diplomarbeit bei Prof.Dr.F.Weigel
1981 - 1986	Medizinstudium an der LMU München
19.4.1984	Eheschließung mit Dr.rer.nat. G.-D. Werner
1985 - 1986	Praktisches Jahr an der LMU München
30.10.1986	3.Staatsexamen
13.11.1986	Approbation

HERSTELLUNG

profi

druck GmbH

Adalbertstr. 10 RG
8000 München 40
(089) 39 07 27

